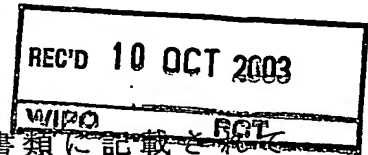


Rec'd PCT/PTO 18 FEB 2005

10/525714
PCT/JP03/10523

20.08.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月20日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-239643
[ST. 10/C]: [JP2002-239643]

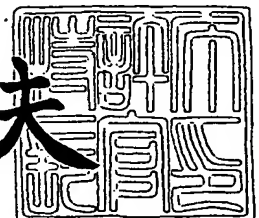
出 願 人
Applicant(s): ソニー株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 0290493702

【提出日】 平成14年 8月20日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
 ソニー株式会社内

 【氏名】 瀬川 雄司

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号
 ソニー株式会社内

 【氏名】 眞峯 隆義

【特許出願人】

 【識別番号】 000002185

 【氏名又は名称】 ソニー株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100112874

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 渡邊 薫

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 076005

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション検出部及びセンサーチップ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域が、前記検出用ヌクレオチド鎖を電界により伸長させながら、誘電泳動の作用によって所定電極部位に固定できる構成とされたハイブリダイゼーション検出部。

【請求項2】 検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域と、

前記反応領域に設けられた共通電極と、

複数の電極が並列されてなる走査電極と、を備え、

前記共通電極と前記走査電極との間でそれぞれ電圧印加可能に構成され、

前記共通電極と前記走査電極を構成する各電極の間に電圧を順次印加していくことによって、前記反応領域に存在する検出用ヌクレオチド鎖を伸長させながら、印加電極へ向けて誘電泳動して、前記走査電極間に橋架けするように固定する構成を備えるセンサーチップ。

【請求項3】 各電極のエッジが互いに対向するように配置された2列の前記走査電極を備えることを特徴とする請求項1記載のセンサーチップ。

【請求項4】 前記走査電極の対向する各電極間の距離が、電圧が印加されていく順番方向に段階的に長くなるように構成されたことを特徴とする請求項3記載のセンサーチップ。

【請求項5】 前記共通電極と前記走査電極を構成する電極の間に電圧を順次印加していくことによって、前記反応領域に存在する標的ヌクレオチド鎖を伸長させながら、前記走査電極間に固定された状態の前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせることを特徴とする請求項2記載のセンサーチップ。

【請求項6】 前記走査電極の端部形状が、円弧状又は多角形状を備えることを特徴とする請求項2記載のセンサーチップ。

【請求項 7】 前記共通電極及び前記走査電極によって形成される電界が、交流であることを特徴とする請求項 2 記載のセンサーチップ。

【請求項 8】 請求項 1 記載のハイブリダイゼーション検出部を備えることを特徴とするセンサーチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、DNAチップ等のセンサーチップに好適に利用できるハイブリダイゼーション検出部に係わる技術に関する。より詳細には、ハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域において、伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を走査電極間に整列固定させることによって、ハイブリダイゼーション効率の向上を図る技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

本発明の主たる従来技術を以下説明する。現在、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップ又はDNAマイクロアレイ（以下、「DNAチップ」と総称。）と呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板が、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等にご利用されており、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の分野において広範囲に活用され始めている。

【0003】

このDNAチップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種・多数のDNAオリゴ鎖やcDNA（complementary DNA）等が集積されていることから、ハイブリダイゼーション等の分子間相互反応の網羅的解析が可能となる点が特徴とされている。

【0004】

DNAチップによる解析手法の一例を簡潔に説明すれば、ガラス基板やシリコン基板上に固相化されたDNAプローブに対して、細胞、組織等から抽出したmRNAを逆転写PCR反応等によって蛍光プローブdNTPを組み込みながらP

CR増幅し、前記基板上においてハイブリダイゼーションを行い、所定の検出器で蛍光測定を行うという手法である。

【0005】

ここで、DNAチップは二つのタイプに分類できる。第1のタイプは、半導体露光技術を応用したフォトリソグラフィーの技術を用いて、所定の基板上に直接オリゴヌクレオチドを合成していくものであり、アフィメトリクス社（Affymetrix社）によるものが代表的である（例えば、特表平4-505763号報参照）。この種のチップは、集積度は高いが、基板上でのDNA合成には限界があって、数十塩基程度の長さである。

【0006】

第2のタイプは、「スタンフォード方式」とも称されるもので、先割れピンを用いて、予め用意されたDNAを基板上に分注・固相化していくことによって作製されるものである（例えば、特許第3272365号公報参照）。この種のチップは、集積度は前者に比べて低いが、1kb程度のDNA断片を固相化できるという利点がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記した従来のDNAチップ技術では、検出表面部位（スポット部位）に固定化されたDNAプローブ等の検出用ヌクレオチド鎖は、ブラウン運動の作用でランダムコイル状に絡まったり、丸まったり等しており、また、検出表面においてその集積密度に偏りがあった。

【0008】

このため、標的ヌクレオチド鎖とのハイブリダイゼーションの際には立体障害が発生するので、ハイブリダイゼーションの効率が悪く、反応にも長時間を要し、更には、擬陽性又は偽陰性を示してしまう可能性もあるという技術的課題があった。

【0009】

そこで、本発明は、検出表面部位においてハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域において、伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を整列固定させるよう

に工夫することによって、ハイブリダイゼーション効率の向上を図ることを主な目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

上記技術的課題を解決するために、まず、本願においては、以下の「ハイブリダイゼーション検出部」並びに該検出部を備える「センサーチップ」を提供する。

【0011】

まず、本願では、検出用ヌクレオチド鎖と該検出用ヌクレオチド鎖と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域が、前記検出用ヌクレオチド鎖を電界により伸長させながら、誘電泳動の作用によって所定電極部位に固定できる構成とされたハイブリダイゼーション検出部を提供する。

【0012】

次に本願では、前記検出部を備えるセンサーチップを提供する。具体的には、前記同様の反応領域と、該反応領域に設けられた共通電極と、該共通電極との間でそれぞれ電圧印加可能に構成された複数の電極が並列されてなる走査電極と、を備え、前記共通電極と前記走査電極を構成する各電極の間に電圧を順次印加していくことによって、前記反応領域に存在する検出用ヌクレオチド鎖を伸長させながら、印加電極へ向けて誘電泳動し、前記電極間に橋架けするように固定する構成を備えるセンサーチップを提供する。

【0013】

なお、前記走査電極の端部形状は、電界形成及び固定容易性の観点から、矩形状の他、円弧状又は三角形状等の多角形状としてもよく、前記共通電極は、平行に配置される構成が望ましい。

【0014】

本発明に係るハイブリダイゼーション検出部及びセンサーチップでは、前記反応領域に電界を形成することにより検出用ヌクレオチド鎖を伸長させながら、走査電極のエッジ周辺領域に、局所的に不均一電界（電気力線が一部に集中する電

界)を形成し、これにより、前記反応領域に存在する伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を走査電極のエッジに誘電泳動して、検出用ヌクレオチド鎖を(走査電極を構成する)電極間に橋架けするように固定させていくことができる。

【0015】

走査電極を構成する電極の数は、目的や条件に応じて適宜決定できる。電極が適当数設けられた走査電極においては、チップに設けられたスイッチを切り替えていくことで、共通電極との間で電圧が印加される電極を順番に選択していくことによって、各電極に近在する(伸長状態の)検出用ヌクレオチド鎖を、誘電泳動の作用によって走査電極側に引き付け、走査電極の各エッジ間に橋架け状態となるように次々に固定させていくことができる。

【0016】

上記手段により、反応領域に滴下されて分散し、ブラウン運動によってランダムコイル状に絡み合った形態となっている(ハイブリダイゼーションには適さない形態の)検出用ヌクレオチド鎖を、伸長させてハイブリダイゼーションし易い直鎖状の形態に調整し、更に、検出用ヌクレオチド鎖を、伸長状態のままで走査電極部位に整列固定させていくことによって、固定化される検出用ヌクレオチド鎖の配列密度を平均化できる。

【0017】

なお、検出用ヌクレオチド鎖の伸長は、 1 MV/m 程度の高周波電界を印加すると、ヌクレオチド鎖(リン酸イオン等を備えるヌクレオチド鎖の陰電荷とイオン化した水素原子の陽電荷で構成される多数の分極ベクトルからなるヌクレオチド鎖)に誘電分極が生じ、その結果、ヌクレオチド分子が電界と平行に直線状に引き伸ばされるという原理に基づいている。伸長されたヌクレオチド鎖は、塩基同士が重層することが無くなる結果、反応時の立体障害がなくなり、近在するヌクレオチド鎖とのハイブリダイゼーション反応が円滑に行われるようになる。

【0018】

本発明に係るセンサーチップでは、各電極のエッジが互いに対向するように配置された2列の前記走査電極を反応領域に設けてもよい。具体的には、各列の対向する電極と共通電極の間に順次電圧を印加していくことによって、一列のみの

走査電極の場合と比較して、反応領域中に存在する検出用ヌクレオチド鎖を効率良く固定させていくことができる。

【0019】

また、走査電極の対向する各電極間の距離を、電圧が印加されていく順番方向に段階的に長くなるように構成することによって、反応領域におけるヌクレオチド鎖が、電圧印加された電極エッジに向けて誘電泳動する際に、隣接する電極が物理的障壁になることがなくなるので、反応領域におけるヌクレオチド鎖が円滑に誘電泳動できるようになる。

【0020】

以上のセンサーチップでは、共通電極と走査電極を構成する電極の間に電圧を順次印加していくことによって、前記反応領域に存在する標的ヌクレオチド鎖を伸長させながら、前記走査電極間に固定された状態の前記検出用ヌクレオチド鎖とハイブリダイゼーションさせることができる。即ち、本発明に係るセンサーチップでは、ハイブリダイゼーションの際の立体障害による影響を排除することができる。

【0021】

ここで、本願における主な技術用語の定義付けを行う。

【0022】

ここで、本願において「ヌクレオチド鎖」とは、プリンまたはピリミジン塩基と糖がグリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステルの重合体を意味し、DNAプローブを含むオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、プリンヌクレオチドとピリミジンヌクレオチドが重合したDNA（全長あるいはその断片）、逆転写により得られるcDNA（cDNAプローブ）、RNA、ポリアミドヌクレオチド誘導体（PNA）等を広く含む。

【0023】

「検出用ヌクレオチド鎖」は、前記検出表面に直接的に又は間接的に固定化されるヌクレオチド鎖であり、「標的ヌクレオチド鎖」は、前記検出用ヌクレオチド鎖と相補的な塩基配列を備えるヌクレオチド鎖であって、場合によっては、蛍光物質等により標識される。

【0024】

「ハイブリダイゼーション」は、相補的な塩基配列構造を備えるヌクレオチド鎖間の相補鎖（二重鎖）形成反応を意味する。

【0025】

「反応領域」は、液相中でのハイブリダイゼーション反応の場を提供できる領域である。この反応領域では、一本鎖ヌクレオチド間の相互反応、即ちハイブリダイゼーションに加え、検出用ヌクレオチド鎖から所望の二本鎖ヌクレオチドを形成し、該二本鎖ヌクレオチドとペプチド（又はタンパク質）の相互反応、酵素応答反応その他の分子間相互反応も行わせることができる。例えば、前記二本鎖ヌクレオチドを用いる場合は、転写因子であるホルモンレセプター等のレセプター分子と応答配列DNA部分の結合等を分析することができる。

【0026】

「立体障害（steric hindrance）」は、分子内の反応中心等の近傍に嵩高い置換基の存在や反応分子の姿勢や立体構造（高次構造）によって、反応相手の分子の接近が困難になることによって、所望の反応（本願では、ハイブリダイゼーション）が起こりにくくなる現象を意味する。

【0027】

「誘電泳動」は、電界が一様でない場において、分子が電界の強い方へ駆動する現象であり、交流電圧をかけた場合も、かけた電圧の極性の反転につれて分極の極性も反転するので、直流の場合と同様に駆動効果が得られる（監修・林 輝、「マイクロマシンと材料技術（シーエムシー発行）」、P 37～P 46・第5章・細胞およびDNAのマニピュレーション参照）。

【0028】

「共通電極」は、複数の電極との間で電圧印加可能な電極を意味する。「走査電極」は、スイッチのオン／オフにより順次電圧印加可能な複数の電極が配列された電極群を意味する。

【0029】

「センサーチップ」は、石英ガラスや合成樹脂等で形成された基板に物質間の相互反応作用を検出できる検出表面及び反応領域が設けられたものを意味し、代

表例としてDNAチップを挙げることができる。

【0030】

以上のように、本発明は、遺伝子の変異解析、SNPs（一塩基多型）分析、遺伝子発現頻度解析等において必須となるハイブリダイゼーションの検出を、効率良く実施できるハイブリダイゼーション検出部及び該検出部を備えるDNAチップ等のセンサーチップを、創薬、臨床診断、薬理ジェノミクス、法医学その他の関連産業界に提供するという技術的意義を有している。

【0031】

【発明の実施の形態】

以下、添付図面に基づいて、本発明の好適な実施形態について説明する。

【0032】

まず、図1は、本発明に係るハイブリダイゼーション検出部（以下、「検出部」と略称する。）並びに該検出部を備えるセンサーチップの第1実施形態の要部構成を表す図である。

【0033】

符号1aで示された第1実施形態である検出部には、まず、反応領域Rが設けられている。この反応領域Rは、検出用ヌクレオチド鎖X又は標的ヌクレオチド鎖Yを含む試料溶液が所定のタイミングで添加される溶液貯留領域であって、ハイブリダイゼーションの反応の場を提供する領域又は空間である。

【0034】

この反応領域Rには、符号Aで示される共通電極と、この共通電極Aとそれぞれ平行に配置された走査電極群C（ $C_1 \sim C_z$ ）と、が配設されている。共通電極Aは、電源 V_1 に接続されており、一列に配置された走査電極群Cの各電極 $C_1 \sim C_z$ は、スイッチ $S_1 \sim S_z$ を順にオンにしていくことで電源 V_1 に接続される構成となっている。図1は、スイッチ S_y がオンにされ、電極A- C_y 間に電圧が印加されている状態（段階）を示している。

【0035】

なお、走査電極C群を構成する各電極 $C_1, C_2 \dots$ の配置間隔は、本発明の目的上、（伸長状態の）検出用ヌクレオチド鎖の分子長以下とする（後述の走

査電極群B、D、Fについても同様)。

【0036】

共通電極Aと走査電極群Cを構成する各電極 $C_1 \sim C_z$ との間に、スイッチ $S_1 \sim S_z$ を切り替えて、高周波電圧を順番に印加していくと、電極Aと各電極 $C_1 \sim C_z$ の間の反応領域Rには、不均一電界(電気力線が一部に集中する電界)が形成される。なお、電界は、約 1×10^6 V/m、約1MHzという条件が、好適である(Masao Washizu and Osamu Kurosawa: "Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures", IEEE Transaction on Industrial Application Vol.26, No.26, p.1165-1172(1990)参照)。

【0037】

前記不均一電界の作用によって、前記反応領域R中にランダムコイル状等の形態で分散して存在している検出用ヌクレオチド鎖Xは、電界に沿った方向に伸長し、直鎖状とされる(原理については既述)。

【0038】

このヌクレオチド鎖の伸長作用と同時に、電圧が印加された各電極 $C_1 \sim C_z$ のエッジE周辺に形成された不均一電界(電気力線が一部に集中する電界)により、前記反応領域Rにおいて伸長状態とされた検出用ヌクレオチド鎖Xは、各電極 $C_1 \sim C_z$ の各エッジEに向けて誘電泳動され、検出用ヌクレオチド鎖Xは、各電極間($C_1 - C_2$, $C_2 - C_3$, $\dots C_y - C_z$)に橋架けされるように固定される。

【0039】

より具体的には、反応領域Rにおいて伸長状態とされた検出用ヌクレオチド鎖Xの一端部は、不均一電界による誘電泳動により電極 C_1 のエッジ E_1 に引き寄せられて接着し、続いて、該ヌクレオチド鎖Xの残りの他端部は、次に電圧印加される隣の電極 C_2 のエッジに引き寄せられて接着固定される。このようにして、検出用ヌクレオチド鎖Xは、各電極間($C_1 - C_2$, $C_2 - C_3$, $\dots C_y - C_z$)に橋架けされるように固定されることになる。なお、図中の符号X'は、エッジEに固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖を表している。

【0040】

続いて、図2は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第2実施形態の要部構成を表す図である。

【0041】

検出部1bには、上記検出部1aと同様に、反応領域Rに共通電極Aが設けられている。この検出部1bには、2列の走査電極群B、Cが配設されており、走査電極群Bを構成する各電極 $B_1, B_2, B_3 \cdots B_x, B_y \cdots B_z$ の各エッジeは、走査電極群Cを構成する各電極 $C_1, C_2, C_3 \cdots C_x, C_y \cdots C_z$ の各エッジEとそれぞれ対向するように配置されている。

【0042】

ここで、走査電極群Bの各電極 $B_1 \sim B_z$ は、スイッチ $s_1 \sim s_z$ を順にオンにしていくことで電源 V_1 に導通され、走査電極群Cの各電極 $C_1 \sim C_z$ は、スイッチ $S_1 \sim S_z$ を順にオンにしていくことで電源 V_1 に導通される構成となっている。即ち、スイッチ s_1 及び S_1 をオンすると、共通電極A- B_1, C_1 間に電圧が印加され、スイッチ s_2 及び S_2 をオンすると、共通電極A- B_2, C_2 間に電圧が印加される。なお、図2は、スイッチ S_y, s_y がオンにされ、電極A- C_y, B_y 間に電圧が印加された状態を示している。

【0043】

続いて、図3は、本発明に係る検出部及びセンサーチップの第3実施形態の要部構成を表す図である。

【0044】

図3に示された検出部1cには、上記検出部1a、1bと同様に、反応領域Rに共通電極Aが設けられているとともに、2列の走査電極群D、Fが配設されている。走査電極群Dを構成する各電極 $D_1, D_2, D_3 \cdots D_x, D_y \cdots D_z$ の各エッジEは、走査電極群Fを構成する各電極 $F_1, F_2, F_3 \cdots F_x, F_y \cdots F_z$ の各エッジeとそれぞれ対向するように配置されている。

【0045】

走査電極群Dの各電極 $D_1 \sim D_z$ は、スイッチ $S_1 \sim S_z$ を順にオンにしていくことで電源 V_1 に導通され、走査電極群Fの各電極 $F_1 \sim F_z$ は、スイッチ $s_1 \sim s_z$ を順にオンにしていくことで電源 V_1 に導通される構成となっている。

即ち、スイッチ S_1 及び s_1 をオンすると、共通電極 $A-D_1$, F_1 間に電圧が印加され、スイッチ s_2 及び S_2 をオンすると、共通電極 $A-D_2$, F_2 間に電圧が印加される。なお、図 3 は、スイッチ S_y , s_y がオンにされ、電極 $A-D_y$, F_y 間に電圧が印加された状態を示している。

【0046】

ここで、図 3 の本第 3 実施形態においては、各電極 D_1 と F_1 , D_2 と F_2 , D_3 と F_3 ... D_z と F_z の間の距離 L が徐々に長くなるように構成されている。この走査電極群 D , F を構成する各対向電極間の距離を徐々に長くし、電極間の反応場が徐々に拡大する構成を採用したことによって、反応領域 R において、電圧印加された電極（のエッジ）に向けて誘電泳動する検出用ヌクレオチド鎖 X は、隣接する電極（電圧が印加されていない電極）によって物理的に邪魔されることなく、円滑に移動できるようになるという望ましい効果が得られる。標的ヌクレオチド鎖 Y の誘電泳動の際にも同様の効果が得られる。

【0047】

次に、図 4 (A) は、図 1 中の $I-I$ 線矢視断面図であり、図 4 (B) は、図 2 (A) で示された検出部 $1a$ の変形形態（符号 $1'a$ ）を表す $I-I$ 線矢視断面図である。

【0048】

図 4 に示されているように、検出部 $1a$, $1'a$ は、石英ガラスやシリコン、ポリカーボネート、ポリスチレン等の合成樹脂で形成された基板 G_1 , G_2 の間の狭小な間隙に配設されている。検出部 $1a$ では、共通電極 A , 走査電極群 C の厚みと反応領域 R の深さ（又は幅）が一致した構成が採用されている。

【0049】

場合によっては、図 4 (B) に示される検出部 $1'a$ のように、誘電体 U によって共通電極 A , 走査電極群 C を挟持させる構成も採用できる。これにより基板 G_1 , G_2 の間隔を広げ、反応領域 R の容積を増やすことができる。なお、図示はしないが、反応領域 R には、走査電極 C 群を反応領域 R の深さ方向に複数列並べて配置してもよい（検出部 $1b$, $1c$ においても同様）。

【0050】

上記構成の検出部 1 a ~ 1 c では、反応領域 R に添加された標的ヌクレオチド鎖 Y は、電極 A-B ($B_1 \sim B_z$)、A-C ($C_1 \sim C_z$)、A-D ($D_1 \sim D_z$)、A-F ($F_1 \sim F_z$) のそれぞれの間に形成された電界の作用を受けて、検出用ヌクレオチド鎖 X と同様に電界の作用で伸長されながら、走査電極群 B ~ F に固定化された状態の (伸長された) 検出用ヌクレオチド鎖 X' に引き寄せられ、立体障害の影響もなく、効率の良いハイブリダイゼーションが進行する。

【0051】

なお、図 1 は、走査電極 $C_x - C_y$ 間に固定された検出用ヌクレオチド鎖 X' と伸長作用を受けた標的ヌクレオチド鎖 Y との間でハイブリダイゼーションが進行する様子、図 2 は、走査電極 $B_x - B_y$ 間並びに $C_x - C_y$ 間に固定された検出用ヌクレオチド鎖 X' と伸長作用を受けた標的ヌクレオチド鎖 Y との間でハイブリダイゼーションが進行する様子、図 3 は、走査電極 $D_x - D_y$ 間並びに $F_x - F_y$ 間に固定された検出用ヌクレオチド鎖 X' と伸長作用を受けた標的ヌクレオチド鎖 Y との間でハイブリダイゼーションが進行する様子をそれぞれ模式的に示していることに言及しておく。

【0052】

ここで、図 5 は、走査電極群 C を代表例として、走査電極のエッジ E の代表的な実施形態を表している。図 5 (A) は、符号 E a で示される矩形状のエッジを備える走査電極、図 5 (B) は、符号 E b で示される三角形状のエッジを備える走査電極、図 5 (C) は、符号 E c で示される円弧状のエッジを備える走査電極をそれぞれ表している。電気力線を集中させて不均一電界を形成し易く、かつ検出用ヌクレオチド鎖 X を固定し易い形状でもあることから、円弧状のエッジ E c を備える走査電極が特に好適と考えられる (走査電極 B、D、F についても同様)。

【0053】

なお、走査電極のエッジ E (e) の各表面は、検出用ヌクレオチド鎖 X の末端がカップリング反応等の反応によって固定されるように表面処理してもよい。一例を挙げれば、ストレプトアビジンによって表面処理された検出表面の場合には、ビオチン化されたヌクレオチド鎖末端の固定化に適している。

【0054】

続いて、電圧印加操作例を図6に基づいて説明する。なお、図6(A)は、検出部1aに対応する電圧印加操作例、図6(B)は、検出部1bに対応する電圧印加操作例、図6(C)は、検出部1bに対応する電圧印加操作例をそれぞれ表している。

【0055】

図1の検出部1aでは、図6(A)に示すように、電極A-C₁、電極A-C₂・・・間に、順番に電圧を印加していき、図2の検出部1bでは、図6(B)に示すように、電極A-C₁・B₁、電極A-C₂・B₂・・・間に、順番に電圧を印加していき、図3の検出部1cでは、図6(C)に示すように、電極A-D₁・F₁、電極A-D₂・F₂・・・間に、順番に電圧を印加していく。なお、それぞれの電圧印加時間は適宜決定できる。

【0056】

また、上記順番の一連の電圧印加操作を必要に応じて複数回繰り返してもよい。一連の電圧印加操作を繰り返すことによって、検出用ヌクレオチド鎖Xは走査電極により確実に固定できるという効果が得られる。

【0057】

更に、図7に示すように、各検出部1a～1bにおける各電極間の電圧印加の際に、電圧のオン／オフを所望の回数だけ繰り返して、断続的に電圧を印加することによって、検出用ヌクレオチド鎖Xの固定のタイミングを調整したり、あるいは既に固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖X' に対して、反応領域R中の標的ヌクレオチド鎖Yを段階的に接近させたり、または標的ヌクレオチド鎖Yを前後に移動させたり、更には、反応のタイミングを調整したりすることが可能となる。

【0058】

また、各電極間における電圧印加の際に、電圧オフとなる時間T(図7参照)を確保することによって、直鎖状の標的ヌクレオチド鎖Yと直鎖状の検出用ヌクレオチド鎖X' との間の相補鎖形成反応、即ちハイブリダイゼーションを、専らブラウン運動に委ねて進行させることができる。

【0059】

以上の電圧印加操作により、直鎖状に伸長されて走査電極群B、C、D、Fに固定された状態の検出用ヌクレオチド鎖X'と該検出用ヌクレオチド鎖X'と同様に直鎖状に伸長された標的ヌクレオチド鎖Yとの相補性のある塩基間の水素結合の形成は、立体障害の問題もなく、効率良く進行する。

【0060】

即ち、検出用ヌクレオチド鎖X'と前記標的ヌクレオチド鎖Yとのハイブリダイゼーション反応が効率良く進行するという結果が得られる。この結果、ハイブリダイゼーションの反応時間が短縮されるとともに、擬陽性又は偽陰性を示す確率も減少するという好ましい結果が得られる。

【0061】

なお、ハイブリダイゼーションの検出は、慣用の方法によって実施でき、例えば、標的ヌクレオチド鎖Yに標識された蛍光色素や二重鎖ヌクレオチドの塩基間に特異的に結合するPOPO-1やTOTO-3等の蛍光インターカレータに励起光を照射し、得られる蛍光を慣用のディテクタを用いて検出できる。

【0062】

より具体的には、レーザー光（例えば、青色レーザー光）を照射して反応領域Rを励起し、蛍光強度の大きさを検出器（図示せず。）によって検出し、検出用ヌクレオチド鎖X'と標的ヌクレオチド鎖Yの間のハイブリダイゼーションの状態を判断する。最後に、各反応領域Rに対する蛍光強度をA/D変換し、結合反応割合をコンピュータCの画面に分布表示することによって、視覚化することができる。なお、本発明において、ハイブリダイゼーションの検出方法は、特に限定されることはない。

【0063】

【発明の効果】

本発明は、DNAチップ等のセンサーチップ表面部位においてハイブリダイゼーションの場を提供する反応領域に、伸長状態に調整された検出用ヌクレオチド鎖を反応領域中（の走査電極間）に整列固定させることによって、ハイブリダイゼーション効率の向上、反応時間の短縮、偽陽性又は偽陰性の発生防止等を確実に

に達成できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に係るハイブリダイゼーション検出部 (1 a) 及びセンサーチップの要部構成を表す図

【図 2】

本発明に係る検出部 (1 b) 及びセンサーチップの要部構成を表す図

【図 3】

本発明に係る検出部 (1 c) 及びセンサーチップの要部構成を表す図

【図 4】

(A) 図 1 に表された検出部 (1 a) の I-I 線矢視断面図

(B) (A) 図で示された検出部 (1 a) の変形形態 (1' a) を表す I-I 線矢視断面図

【図 5】

(A) エッジが矩形状の走査電極を表す図

(B) エッジが三角形状の走査電極を表す図

(C) エッジが円弧状の走査電極を表す図

【図 6】

(A) 検出部 (1 a) における電圧印加操作の一例を表す図

(B) 検出部 (1 b) における電圧印加操作の一例を表す図

(C) 検出部 (1 c) における電圧印加操作の一例を表す図

【図 7】

検出部 (1 a ~ 1 c) に共通する電圧印加操作の一例を表す図

【符号の説明】

1 (1 a, 1' a, 1 b, 1 c) ハイブリダイゼーション検出部

A 共通電極

B (B₁, B₂, B₃, . . . B_x, B_y, B_z) 走査電極 (群)

C (C₁, C₂, C₃, . . . C_x, C_y, C_z) 走査電極 (群)

D (D₁, D₂, D₃, . . . D_x, D_y, D_z) 走査電極 (群)

R 反応領域

S, s スイッチ

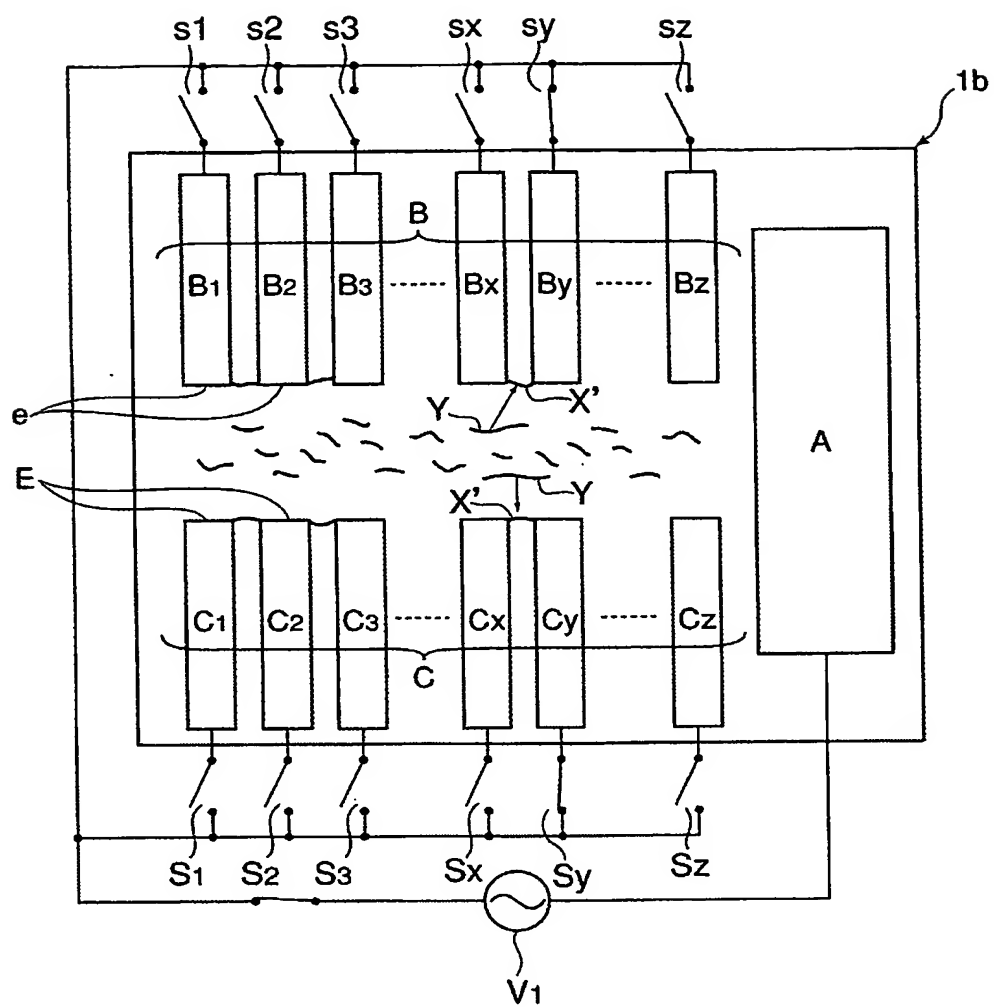
V₁ 電源

X 検出用ヌクレオチド鎖

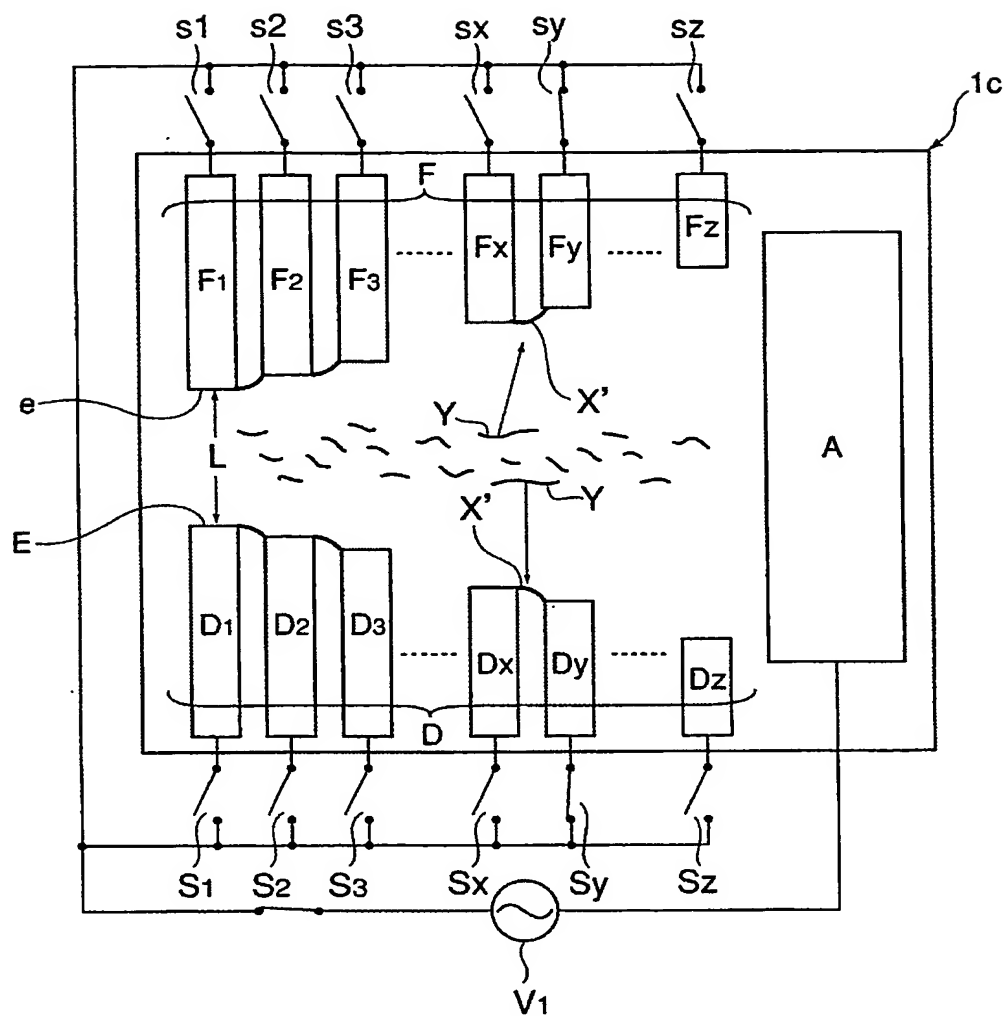
X' 固定化された検出用ヌクレオチド鎖

Y 標的ヌクレオチド鎖

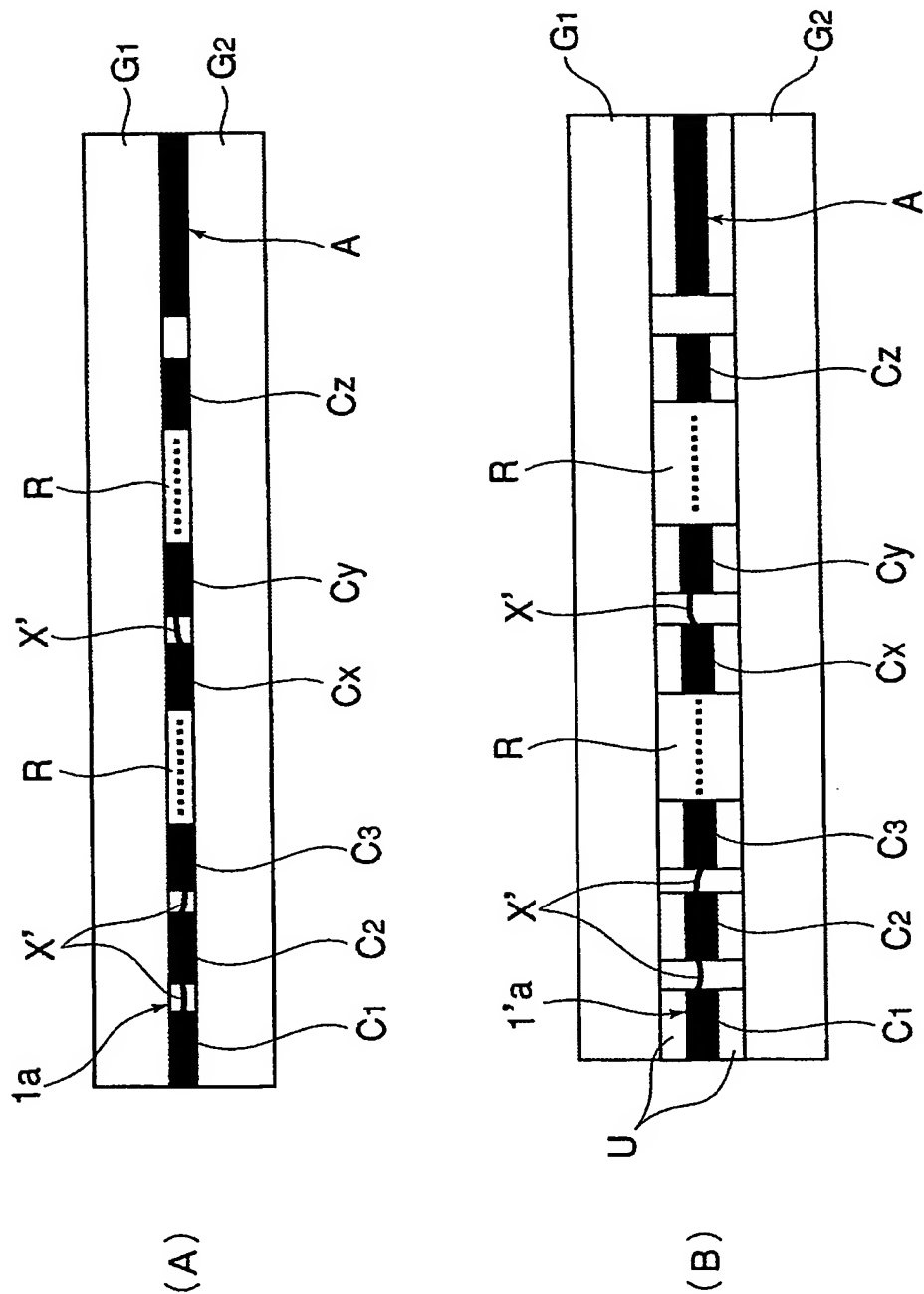
【図 2】



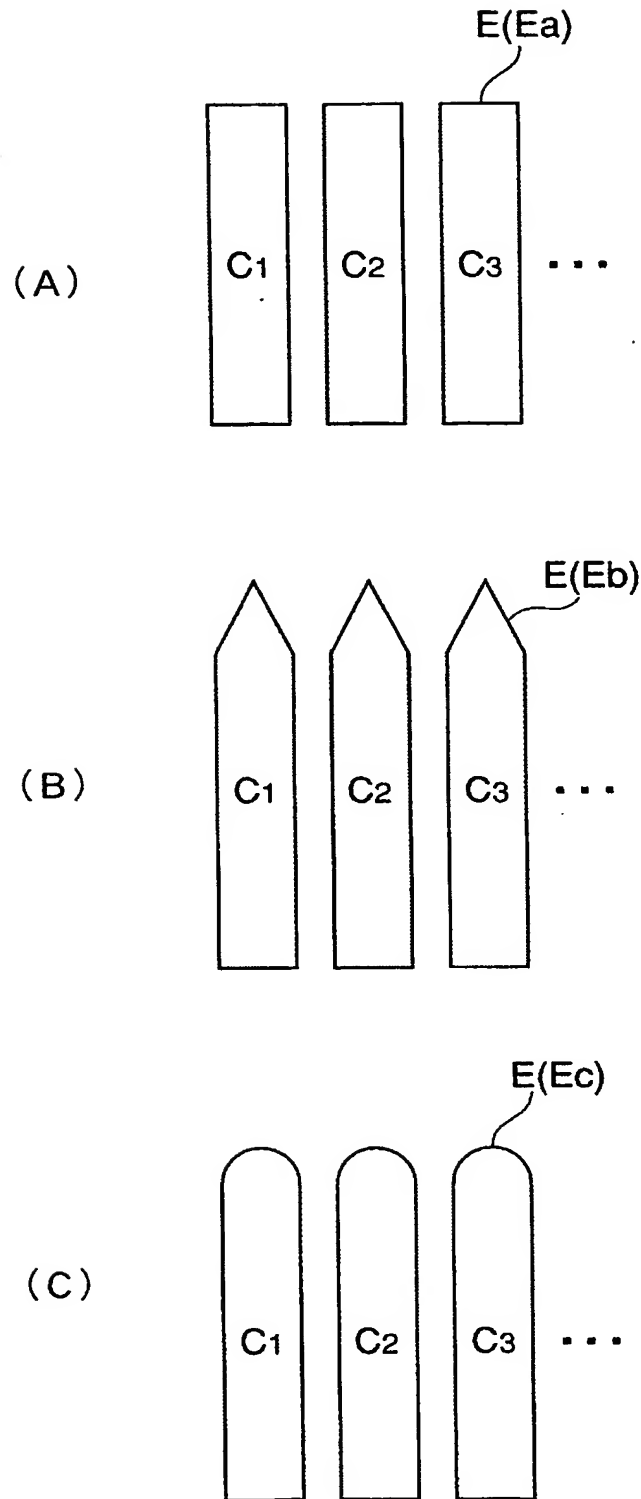
【図 3】



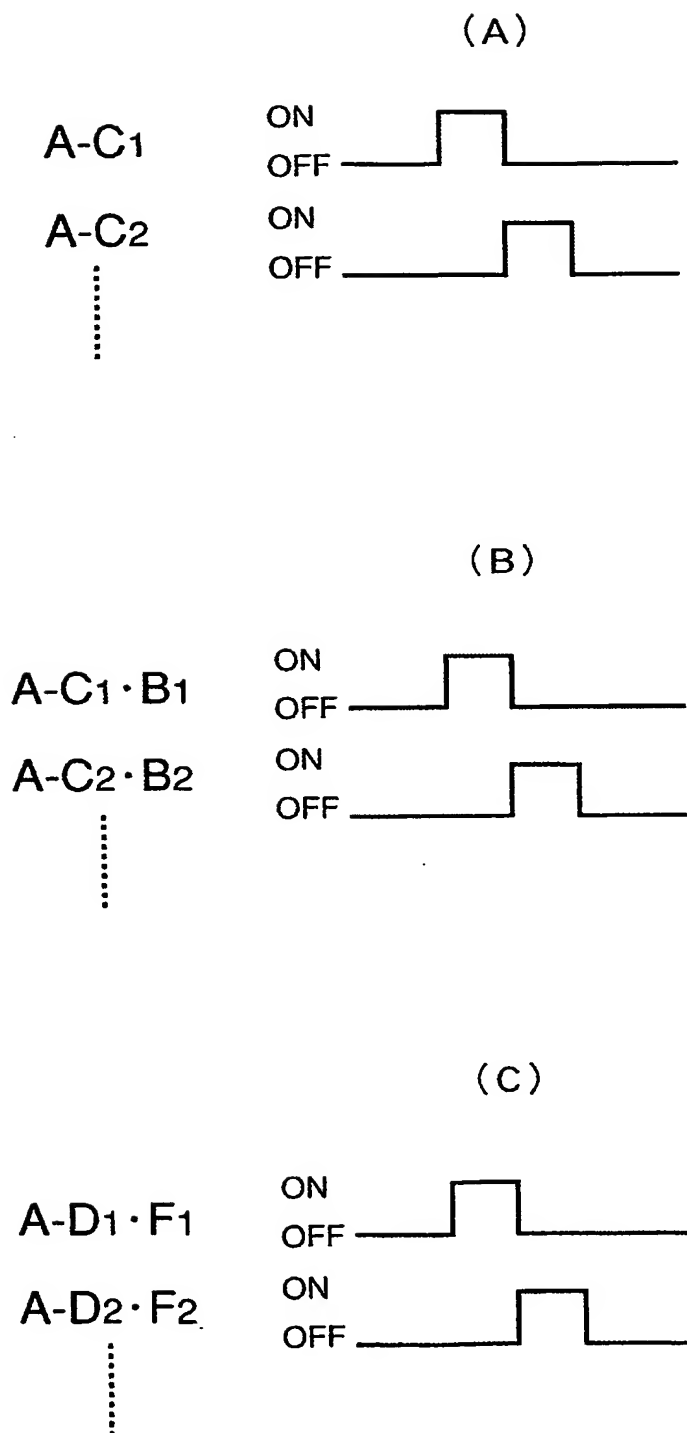
【図 4】



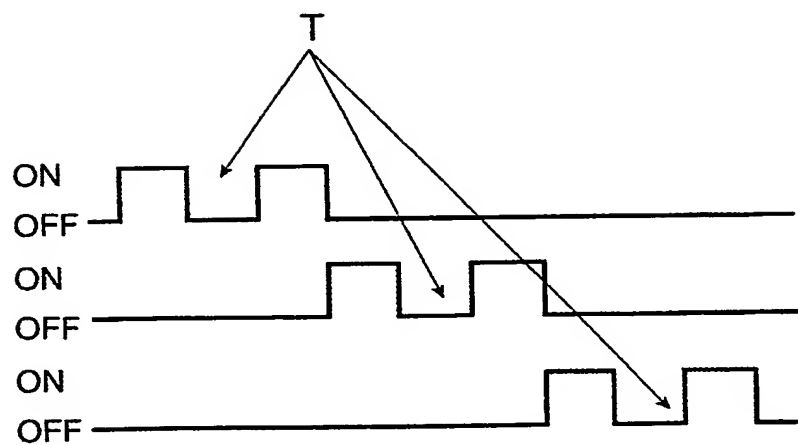
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 伸長状態の検出用ヌクレオチド鎖を整列固定させるように工夫することによって、ハイブリダイゼーション効率の向上を図ること。

【解決手段】 検出用ヌクレオチド鎖 X と該検出用ヌクレオチド鎖 X と相補性のある塩基配列を備える標的ヌクレオチド鎖 Y との間のハイブリダイゼーションの場となる反応領域 R が、前記検出用ヌクレオチド鎖 X を電界により伸長させながら、誘電泳動の作用によって走査電極 C のエッジ E 部位に固定できる構成とされたハイブリダイゼーション検出部 1 a 及びこの検出部 1 a を備えるセンサーチップを提供する。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 2 - 2 3 9 6 4 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 1 8 5]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都品川区北品川 6 丁目 7 番 3 5 号

氏 名

ソニー株式会社